

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/006119

International filing date: 30 March 2005 (30.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-235272
Filing date: 12 August 2004 (12.08.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 May 2005 (20.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 8 月 1 2 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 2 3 5 2 7 2

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

J P 2 0 0 4 - 2 3 5 2 7 2

出 願 人
Applicant(s): 麒麟麦酒株式会社

2 0 0 5 年 4 月 2 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P04-0733
【提出日】 平成16年 8月12日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
【発明者】
 【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所
 内
 【氏名】 渡邊 智子
【特許出願人】
 【識別番号】 000253503
 【氏名又は名称】 麒麟麦酒株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100091096
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 平木 祐輔
【選任した代理人】
 【識別番号】 100096183
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 石井 貞次
【選任した代理人】
 【識別番号】 100118773
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 藤田 節
【選任した代理人】
 【識別番号】 100111741
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 田中 夏夫
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2004-107494
 【出願日】 平成16年 3月31日
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 015244
 【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0307451

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

免疫細胞の表面に存在するCD52以外のGPIアンカー蛋白質を、該蛋白質のアゴニストで刺激することを含む、調節性T細胞の分化誘導および/または増殖を促進する方法。

【請求項 2】

上記GPIアンカー蛋白質がT細胞の活性化に関与するものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

上記GPIアンカー蛋白質がCD55、CD59およびCD48からなる群より選択されたものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

上記アゴニストが抗GPIアンカー蛋白質抗体またはそのフラグメントである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

抗GPIアンカー蛋白質抗体ヒト化抗体またはヒト抗体である、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

免疫細胞の表面に存在するCD3を、CD3アゴニストで刺激することをさらに含む、請求項 1～5 のいずれか1項記載の方法。

【請求項 7】

CD3アゴニストが抗CD3抗体またはそのフラグメントである、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

抗CD3抗体がヒト化抗体またはヒト抗体である、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

上記免疫細胞がT細胞である、請求項 1～8 のいずれか1項記載の方法。

【請求項 10】

上記免疫細胞が末梢血単核球である、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

免疫細胞へのCD3アゴニスト刺激およびGPIアンカー蛋白質アゴニスト刺激が、生体外で行われるものである請求項 1～10 のいずれか1項記載の方法。

【請求項 12】

免疫細胞へのCD3アゴニスト刺激およびGPIアンカー蛋白質アゴニスト刺激が、生体内で行われるものである請求項 1～10 のいずれか1項記載の方法。

【請求項 13】

請求項 1～10 のいずれか1項記載の方法により分化誘導および/または増殖を促進することにより得られた調節性T細胞。

【請求項 14】

請求項 1～10 のいずれか1項記載の方法により分化誘導および/または増殖を促進することにより得られた調節性T細胞を含む細胞含有物。

【請求項 15】

請求項 1～10 のいずれか1項記載の方法により分化誘導および/または増殖を促進することにより得られた調節性T細胞を含む、免疫抑制のための医薬組成物。

【請求項 16】

自己免疫疾患、アレルギー疾患または移植免疫応答の予防または治療のための、請求項 15 記載の医薬組成物。

【請求項 17】

調節性T細胞の分化誘導および/または増殖促進効果を有する薬剤となる、CD52以外のGPIアンカー蛋白質に対するヒト化抗体または抗体を作製する方法。

【請求項 18】

GPIアンカー蛋白質が、CD55、CD59およびCD48からなる群より選択されたものである、請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

調節性T細胞の分化誘導および/または増殖促進効果を有する薬剤を、CD52以外のGPIアンカー蛋白質との相互作用を指標にスクリーニングする方法であって、CD52以外のGPIアンカー蛋白質を発現している細胞と候補化合物とを接触させ、これらの相互作用またはGPIアンカー蛋白質刺激応答を検出することを含む、上記方法。

【請求項 2 0】

GPIアンカー蛋白質が、CD55、CD59およびCD48からなる群より選択されたものである、請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 1】

患者本人又は別のヒトの生体内から採取した免疫細胞を、その表面に存在するCD52以外のGPIアンカー蛋白質を該蛋白質のアゴニストで刺激することにより、調節性T細胞への分化を誘導し、かつその増殖を促して得られた、上記ヒトの免疫細胞由来の調節性T細胞。

【請求項 2 2】

GPIアンカー蛋白質が、CD55、CD59およびCD48からなる群より選択されたものである、請求項 2 1 記載の細胞。

【請求項 2 3】

請求項 2 1 または 2 2 記載の調節性T細胞であって、上記採取した免疫細胞を、上記アゴニストで刺激することに加えて、さらにCD3アゴニストで刺激することにより、調節性T細胞への分化を誘導し、かつその増殖を促して得られた、調節性T細胞。

【請求項 2 4】

患者本人又は別のヒトの生体内から採取した免疫細胞を、その表面に存在するCD52以外のGPIアンカー蛋白質を該蛋白質のアゴニストで刺激することにより、調節性T細胞への分化を誘導し、かつその増殖を促し、上記ヒトの免疫細胞由来の調節性T細胞を産生する方法。

【請求項 2 5】

GPIアンカー蛋白質が、CD55、CD59およびCD48からなる群より選択されたものである、請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 6】

請求項 2 4 または 2 5 記載の調節性T細胞を産生する方法であって、上記採取した免疫細胞を、上記アゴニストで刺激することに加えて、CD3アゴニストで刺激することをさらに含む、方法。

【請求項 2 7】

CD52以外のGPIアンカー蛋白質のアゴニストを有効成分として含有する、調節性T細胞の分化誘導および/または増殖促進のための医薬組成物。

【請求項 2 8】

上記GPIアンカー蛋白質がT細胞の活性化に関与するものである、請求項 2 7 記載の医薬組成物。

【請求項 2 9】

上記GPIアンカー蛋白質がCD55、CD59およびCD48からなる群より選択されたものである、請求項 2 7 記載の医薬組成物。

【請求項 3 0】

上記アゴニストが抗GPIアンカー蛋白質抗体またはそのフラグメントである、請求項 2 7 記載の医薬組成物。

【請求項 3 1】

上記抗体がヒト化抗体またはヒト抗体である、請求項 3 0 記載の医薬組成物。

【請求項 3 2】

CD3アゴニストをさらに含む、請求項 2 7 記載の医薬組成物。

【請求項 3 3】

CD3アゴニストが抗CD3抗体またはそのフラグメントである、請求項 3 2 記載の医薬組成物。

【請求項 3 4】

抗CD3抗体がヒト化抗体またはヒト抗体である、請求項33記載の医薬組成物。

【請求項35】

自己免疫疾患、アレルギー疾患または移植免疫応答の予防または治療のための、請求項27～34のいずれか1項記載の医薬組成物。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 GPIアンカー蛋白質アゴニストによる調節性T細胞分化誘導・増殖方法およびそのための医薬組成物

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫を調節する新しい方法、特に調節性T細胞（抑制性T細胞と呼ばれる場合もある）の分化誘導・増殖促進することにより免疫を調節する方法、および該方法に使用するための医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

1. 調節性T細胞

種々の病原体に対する生体防御のシステムとしての免疫系の中心的役割を担う細胞群の一つにT細胞がある。T細胞は大別してCD4陽性のヘルパー T細胞とCD8陽性の細胞傷害性T細胞に分けられるが、前者は特に抗原刺激後の特定の分化成熟段階でのサイトカイン産生パターンによって、主にIFN- γ を産生するTh1細胞、IL-4を産生するTh2細胞などに分類可能である。一般的に前者は細胞性免疫、後者は液性免疫系の活性化に寄与し、生体防御に深く関与している。免疫応答はこのような性質の異なるT細胞の働きによって巧妙なバランスのもとに病原体の排除や感染抵抗性の獲得に深く関与している。通常健全な免疫応答においては外来の非自己抗原に対してはそれらを排除する機構が働き、生体を構成する自己抗原に対しては免疫学的寛容が成立して排除機構が働かないことが知られている。しかしながら、自己抗原に対し過剰な免疫応答が働くことによって自己免疫疾患が生ずる。このように自己抗原に対する免疫学的寛容は絶対的なものではないが、T細胞レベルにおいても種々の免疫学的寛容が誘導される仕組みが分かっている。一つは、中枢寛容（central tolerance）と呼ばれる胸腺における自己反応性T細胞クローンの排除の機構（Kisielow, P. et al., 1988. *Nature*, 333:742-746.）、他方は末梢寛容（peripheral tolerance）と呼ばれる機構による自己反応性T細胞の胸腺外での制御である。後者には、細胞死の誘導または自己抗原に対する不応答性（anergy）の誘導（Rocha, B., and H. von Boehmer, 1991. *Science*, 251:1225-1228.; Jenkins, M.K., and R. H. Schwartz, 1987. *J. Exp. Med.* 165:302-319.）と共に、調節性T細胞（regulatory T cell）による能動的な抑制機構（Shevach, E.M. 2000. *Annu. Rev. Immunol.* 18:423-449.）が知られている。調節性T細胞とは、他のT細胞に対して抑制的な作用を示すということで定義付けられる。免疫応答は巧妙なバランスのもとに成り立っており、例えば上述のTh1細胞およびTh2細胞は、互いにそれぞれの免疫応答に拮抗的に働き、一方が他方に対する調節性T細胞として作用することが知られるようになった。その反面、調節性T細胞集団の存在の検証とその性状解析については免疫学の近年の歴史においても多くの議論があるところである。このような調節性T細胞はin vitroまたはin vivoにおいて特定の免疫応答を抑制または調節する機能を有する細胞として研究され、細胞表面マーカー、産生するサイトカインの種類およびその産生の抑制および調節機構などによって、種々の細胞集団が報告されている（Roncarolo, M.G., and M.K. Levings, 2000. *Curr. Opin. Immunol.* 12:676-683.）。

【0003】

これらの調節性T細胞の中で近年最もよく研究されている細胞集団は、以下に述べるCD4陽性CD25陽性であることをマーカーとするT細胞集団であり、主にマウスおよびラットなどのヒト以外の生物種で研究されてきた。即ち、正常マウスまたはラットのCD4陽性脾臓細胞からCD25陽性、RT6.1陽性（ラットの成熟T細胞の大部分に発現）、CD5強陽性、またはCD45RB弱陽性（マウス）若しくはCD45RC弱陽性（ラット）の細胞を除去して、残りのT細胞を免疫不全の動物に移入することで臓器特異的自己免疫疾患が誘導されることが明らかとなった。これまで、このような調節性T細胞に特異的なマーカーは見出されておらず、上記のマーカーは調節性T細胞の機能とは直接関連付けられない、細胞が活性化されている状態、抗原刺激を受けた状態または免疫学的記憶状態にあることを表すマーカーにしか過ぎない。しかしながら、免疫不全動物に臓器特異的自己免疫疾患を誘導する機能のみ

ならず、逆に特定の細胞集団を移入することで自己免疫疾患および自己免疫性炎症を抑制する機能を有することを指標として調節性T細胞集団の解析が進み、CD4、CD25共に陽性であるT細胞集団が調節性T細胞のマーカーとなり得ることが知られるに至った（Sakaguchi, S., et al., 1985. *J. Exp. Med.* 161:72; Itoh, M., et al., 1999. *J. Immunol.* 162: 5317-5326; Sakaguchi, S. et al., 1995. *J. Immunol.* 155:1151-1164; Asano, M. et al., 1996. *J. Exp. Med.* 184:387-396; Read, S. et al., 2000. *J. Exp. Med.* 192:295-302; Salomon, B. et al., 2000. *Immunity.* 12:431-440; Stephens, L. A., and D. Mason. 2000. *J. Immunol.* 165:3105-3110.）。

【0004】

上記のようにマウスおよびラットにおいて、CD4陽性CD25陽性の調節性T細胞が同定されたが、一方で、ヒトにおける同様の細胞の存在は、2001年に複数のグループから報告された（Jonuleit, H. et al., 2001. *J. Exp. Med.* 193:1285-1294; Levings, M. K. et al., 2001. *J. Exp. Med.* 193:1295-1301; Dieckmann, D. et al., 2001. *J. Exp. Med.* 193: 1303-1310; Taama, L. S. et al., 2001. *Eur. J. Immunol.* 31:1122-1131; Stephens, L. A. et al., 2001. *Eur. J. Immunol.* 31:1247-1245; Baecher-Allan, C. et al., 2001. *J. Immunol.* 167:1245-1253.）。これらの報告は、マウスで知られているCD4およびCD25の発現を指標にヒト末梢血から分離された細胞集団を用いて種々の細胞表面マーカー、細胞の活性化刺激に対する不応答性（anergy）、産生されるサイトカインの種類、in vitroにおける通常のT細胞の増殖抑制機能およびその機構などの点においてマウスでの報告と同等であることを根拠としている。即ち、ヒト末梢血から分離されたCD4陽性CD25陽性T細胞は、CD45RO陽性のメモリーT細胞マーカーを発現しており、CD4陽性CD25陰性T細胞と比較してHLA-DRなどの活性化マーカーの発現が高く、また、細胞内には定常的にCTLA-4を発現しており、刺激によりその発現量が上昇する。更に、かかるCD4陽性CD25陽性の調節性T細胞は、抗CD3抗体刺激、抗CD3抗体と抗CD28抗体とによる刺激、同種異系の成熟樹状細胞（allogeneic mature DC）による刺激などでは、DNA合成およびサイトカインの産生は見られず、すなわち、CD4陽性CD25陽性の調節性T細胞は、抗原刺激に対する不応答状態（anergy）となっている。CD4陽性CD25陽性調節性T細胞は、抗CD3抗体と抗CD28抗体に加えてIL-2、IL-4、IL-15などのサイトカインによる刺激を加えることで、そのDNA合成能は高まるが、CD4陽性CD25陰性T細胞のそれには及ばない。CD4陽性CD25陽性調節性T細胞存在下で、CD4陽性CD25陰性T細胞を抗CD3抗体または同種異系の成熟樹状細胞（allogeneic mature DC）によって刺激した場合、CD4陽性CD25陽性調節性T細胞非存在下の場合と比較してCD4陽性CD25陽性調節性T細胞細胞数に依存してCD4陽性CD25陰性T細胞の増殖抑制作用が認められる。CD4陽性CD25陽性調節性T細胞は、IL-10、TGF- β 1のような抑制性のサイトカインを産生し得るが、CD4陽性CD25陰性T細胞に対する増殖抑制作用は、上記サイトカインに対する中和抗体では解除されないこと、および、抑制作用にはCD4陽性CD25陰性T細胞とCD4陽性CD25陽性調節性T細胞との直接的な細胞接触が必要であることが報告されている。マウス、ラットおよびヒトにおいてCD4陽性CD25陽性調節性T細胞の存在が報告され、その性状解析が進められているが、いまだその詳細な分化機構および抑制作用機構の解明には至っておらず、該細胞に特異的なマーカーも見出されていない。

【0005】

マウスおよびヒトにおいて、IL-10存在下での同種異系の（allogeneic）抗原刺激や同種異系の未成熟樹状細胞（allogeneic immature DC）による繰り返し刺激によって誘導される調節性T細胞も報告されている（Groux, H. et al., 1997. *Nature.* 389:737-742; Jonuleit, H. et al., 2000. *J. Exp. Med.* 192:1213-1222.）。さらに、ある種のウイルスのentry分子または補体活性化を抑制するとの報告があるCD46とCD3とでT細胞を同時刺激した場合、およびCD58/LFA-3を強制発現させた細胞をAPCとしてT細胞を刺激した場合、調節性T細胞が誘導されるとの報告もある（Kemper, C. et al., 2003. *Nature.* 421:388-392; Wakkach, A. et al., 2001. 167:3107-3113）。これらの細胞は、Th1、Th2細胞とは異なり大量のIL-10を産生するものの、TGF- β 1、IFN- γ 、IL-5の産生量は多くなく、低レベルのIL-2を産生し、IL-4を産生しないことを特徴としており、Tr1細胞と呼ばれている。T

rl細胞もCD4陽性CD25陽性調節性T細胞と同様にanergicであるが、T細胞抑制機構は、自ら産生するIL-10やTGF- β 1により影響を受けることに基づいて、説明可能であるかもしれない。しかしながら、Tr1細胞とCD4陽性CD25陽性調節性T細胞とが全く異なるT細胞サブセットであるのか、または分化活性化段階の異なる同一の細胞であるかについては明確にされていない。

【0006】

その他、ヒトT細胞が血管内皮細胞に接着した後に内皮下への遊走する現象を阻害するモノクローナル抗体である4C8 mAb (Masuyama, J. et al., 1999, J. Exp. Med., 189:979-990)の新たな機能として調節性T細胞誘導能が報告された (Masuyama, J. et al., 2002, J. Immunol. 169:3710-3716; 特開2003-102471)。これは、抗CD3抗体(OKT3)と4C8 mAbとの同時刺激により活性化した細胞が、in vitroにおいてポリクローナル抗体刺激によるCD4陽性T細胞の増殖に対して抑制活性を示すことに依拠している。

【0007】

マウスおよびラットにおいて知られている調節性T細胞マーカーであるCD4、CD25の発現を指標として、ヒトにおいても末梢血などからCD4陽性、CD25陽性のT細胞を分離したところ、ヒトの末梢血から分離されたCD4陽性CD25陽性T細胞は、マウスやラットの同細胞と同様のその他の細胞表面マーカーおよび機能を有していることが確認された。このことから、ヒトにおけるCD4陽性CD25陽性調節性T細胞の存在が示唆された。これら細胞は、末梢血CD4陽性T細胞の5~10%を占めるに過ぎない希少細胞集団であり、活性化・増殖刺激に対して不応答状態にある。この場合、抗CD3抗体と抗CD28抗体による刺激にIL-2、IL-4またはIL-15などのサイトカインを加えることで細胞増殖を促すことができるが、かかる手法による増殖では、ヒトに移入して一定の効果をj得るほどの細胞増幅は得られず、臨床医学的に応用することは困難である。

【0008】

調節性T細胞は、実験動物に移入することによって自己免疫疾患（自己免疫性脳脊髄炎、大腸炎）に抑制的に働くこと (Kohm, A. P. et al., 2002, J. Immunol. 169:4712-4716; Mottet, C., et al., 2003, J. Immunol. 170:3939-3943)、ならびに移植拒絶反応 (HvG) および移植片対宿主病 (GvHD) に抑制的に働くこと (Hara, M. et al., 2001, J. Immunol. 166:3789-3796; van Maurik, A. et al., 2002, J. Immunol. 169:5401-5404; Taylor, P. A. et al., 2001, J. Exp. Med. 193:1311-1317; Taylor, P. A. et al., 2002, Blood. 99:3493-3499; Edinger, M. et al., 2003, Nature Med. 9:1144-1150; Trenado, A. 2003, J. Clin. Invest. 112:1688-1696) がわかっている。したがって、調節性T細胞の免疫抑制作用を利用した細胞医療は、自己免疫疾患および臓器移植による拒絶反応に対する治療への応用が有望視されている。調節性T細胞の増殖を促進する医薬組成物、または患者もしくは別のヒトから採取した末梢血、骨髓細胞を生体外で処理することにより、調節性T細胞を増殖させ、患者の体内に移入するという療法の開発が期待されている。

【0009】

2. GPIアンカー蛋白質

生体膜を構成する蛋白質には、自己のアミノ酸配列に含まれる疎水性部分によって細胞膜に存在している膜貫通型と、脂質により蛋白質が修飾され、脂質の疎水性部分をアンカーとして膜に結合しているものがある。GPIアンカー蛋白質 (Glycosylphosphatidylinositol anchored protein) は後者に属し、蛋白質のC末端部が修飾を受け、オリゴ糖鎖とイノシトールリン脂質からなる複合体脂質を共有結合し、その脂質の疎水性部分を介して膜に結合している。これまで報告されているGPIアンカー蛋白質は200種類以上あり、その機能も分化抗原、酵素、受容体および細胞接着因子等、多岐に渡っている (池澤宏郎, 1999, 蛋白質核酸酵素, 44:1321-1328)。一部のGPIアンカー蛋白質はT細胞にも発現しており、これらのGPIアンカー蛋白質がT細胞の活性化に関与することが報告されている (Horejsi, V. et al., 1998, Immunol. Letter. 63:63-73; Loertscher, R. and Lavery, P. 2002, Transplant Immunol. 9:93-96)。T細胞の活性化に関与すると報告されているGPIアン

カー蛋白質は、マウスではThy-1 (Kroccek, R.A. et al., 1986. J. Immunol. 136:4379-4384)、Ly-6 (Malek, T.R. et al., 1986. J. Exp. Med., 164:709-722)、Qa-2 (Hahn, A.B. et al., 1989. J. Immunol. 143:407-413)、およびCD48 (Kato, K. et al., 1992. J. Exp. Med. 176:1241-1249)、ヒトではCD52 (Valentin, H. et al., 1992. transplantation. 54:97-104; Rowan, W.C. 1995. Int. Immunol. 7:69-77)、CD55 (Davis, L.S. et al., 1988. J. Immunol. 141:2246-2252; Shenoy-Scaria, A. M. et al., 1992. J. Immunol. 149:3535-3541)、CD59 (Korty, P.E. et al., 1991. J. Immunol. 146:4092-4098)、CD73 (Thompson, L.F. et al., 1989. J. Immunol. 143:1815-1821)、BY55/CD160 (Nikolova, M et al., 2002. Int. Immunol. 14:445-451)、およびCD48 (Stefanov, I. et al., 1991. Science 254:1016-1019、Stulnig, T. M. et al., 1997. J. Biol. Chem. 272:19242-19247) などがある。また、GPIアンカー蛋白質はlipid raftと呼ばれるスフィンゴ脂質/コレステロールが豊富な細胞膜上の特定の部位に存在することが示唆されている (Varma, R. and Mayor, S. 1998. Nature. 394:798-801; Friedrichson, T. and Kurzchalia, T. V. 1998. Nature. 394:802-805)。T細胞膜上に存在するlipid raftは、T細胞受容体 (TCR) のシグナル伝達において重要な働きをしていることが報告されている (Xavier, R. et al., 1998. Immunity. 8:723-732; Montixi, C. et al., 1998. EMBO J. 17:5334-5348; Brdicka, T. et al., 1998. Biochem. Biophys. Res. Commun. 248:356-360; Kosugi, A. et al., 1999. Int. Immunol. 11:1395-1401; Zhang, W. et al., 1998. Immunity. 9:239-246; 小杉厚, 2001. 実験医学(増刊). 19:94-101)。CD3刺激等によりT細胞上のTCRが架橋されると、細胞骨格の変化が誘導され、lipid raftは細胞膜上でTCR周辺に集積してくると考えられている。このような細胞膜上のダイナミックな変化により、TCRが、lipid raftの細胞内ドメインに存在しているsrc ファミリーに属するチロシンキナーゼ等のシグナル伝達因子にアクセスすることが可能になり、シグナルを伝達していると考えられている (Horejsi, V. et al., 1999. Immunol. Today. 20:356-361; Simons, K. and Toomre, D. 2000. Nature Reviews Mol. Cell Biol. 1:31-39; Cherukuri, A. et al., 2001. Immunity. 14:657-660)。細胞内ドメインを持たないGPIアンカー蛋白質がどのようにT細胞の活性化に寄与しているのかについては不明な点が多いが、一つにはTCRを介した刺激と同様に、GPIアンカー蛋白質が存在するlipid raftの細胞内ドメインに存在する種々のシグナル伝達分子を介している可能性が考えられる (Horejsi, V. et al., 1998. Immunology Letters. 63:63-73; Loertscher, R. and Lavery, P. 2002. Transplant Immunol. 9:93-96)。また、GPIアンカー蛋白質は、その種類に関わらず、lipid raftを介して、共通なシグナルを伝達しているのではないかと考えられている (Hale, G. 2001. Cytotherapy. 3:137-143)。実際、GPIアンカー蛋白質のクロスリンクによって、リン酸化されるシグナル伝達因子に共通性が高いことが報告されている (Rosemarie, A. et al., 2000. Int. Immunol. 12:505-516; Tosello, A. et al., 1998. J. Inflamm. 48:13-27)。TCR刺激と同時にGPIアンカー蛋白質をクロスリンクさせた場合、TCRからのシグナルが修飾を受けることは十分に考えられるが、GPIアンカー蛋白質を介したシグナルにより、T細胞から調節性T細胞が誘導されるとの報告はこれまで全くない。

【0010】

3. CD59抗原

CD59は約20kDaのGPIアンカー蛋白質であり、構造的にはLy6ファミリーに属しており、血液系を含む多様な組織の細胞で発現している。CD59は、補体成分の1つであるC9に結合し、後期補体成分集合の最終段階であるC5b-8へのC9の結合を阻害する。これにより、細胞膜上での膜傷害性複合体形成を抑制し、補体系による傷害から細胞を保護している。更にT細胞においては、上記補体系の抑制作用以外に、CD2との相互作用による接着への関与も知られている (Lovelan, B. 2002. "CD59" in Leukocyte Typing VII, Oxford University Press:807-809)。

【0011】

また、T細胞の活性化において、単独ではT細胞を活性化しない低用量のPMAで刺激する際に抗CD59抗体を用いてCD59抗原をクロスリンクすることで、副刺激として作用し、T細胞

細胞を活性化・増殖させることが報告されている (Korty, P.E. et al., 1991. J. Immunol., 146:4092-4098)。ただし、CD59の副刺激によるT細胞の機能への影響は明らかにされていない。

【0012】

4. CD55抗原

CD55は約70kDaのGPIアンカー蛋白質であり、血液系を含む全身の組織で広く発現している。CD55は、補体成分の1つであるC3bとC4bとに結合してC3転換酵素の形成を阻害するほか、C3bBbとC4b2aとに結合してC3転換酵素の分解を促進し、補体制御因子として補体系による傷害から細胞を保護していることが知られている (Lovelan, B. 2002. "CD55" in Leukocyte Typing VII, Oxford University Press:804-805)。

【0013】

また、T細胞においては、他のGPIアンカー蛋白質同様に、CD59抗原のクロスリンクによって副刺激として作用することが知られている。単独ではT細胞を活性化しない低用量のPMAで刺激する際に抗CD55抗体を用いてCD55をクロスリンクすることでCD4陽性T細胞およびCD8陽性T細胞を増殖させる (Davis, L.S. et al., 1988. J. Immunol. 141:2246-2252)。また、このCD55による副刺激においてGPIアンカーの存在は必須であり、CD55をGPIアンカーではなくCD46の膜貫通ドメインと融合させた形で発現させたキメラCD55分子では、クロスリンクによる副刺激が認められないことが知られている (Shenoy-Scaria, A. M. et al., 1992. J. Immunol. 149:3535-3541)。ただし、CD55の副刺激を受けることによるT細胞の機能への影響については知られていない。

【0014】

5. CD48抗原

CD48は45kDaのGPIアンカー蛋白質であり、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する。白血球に広く発現されており、リンパ球では活性化によって発現の亢進がみられる。マウスではCD48はCD2と結合することで細胞の接着に関わる事が知られているが、ヒトではCD48とCD2のアフィニティは非常に低い。疾患との関連については、発作性夜間血色素尿症患者でCD48陽性のリンパ球頻度が低下することが知られている (Lo, M.F., Sandrin, M. 2002. "CD48" in Leukocyte Typing VII, Oxford University Press:797-798)。

【0015】

T細胞に発現するCD48の副刺激分子としての機能はマウスで特に調べられており、抗CD3抗体刺激で刺激する際に抗CD48抗体によってCD48をクロスリンクするとT細胞の増殖が亢進する (Kato, K. et al., 1992. J. Exp. Med. 176:1241-1249) 他、CD48のリガンドであるCD2をトランスフェクトした抗原提示細胞ではT細胞刺激能が亢進すること (Moran, M. et al., 1998. Immunity 9:787-796)、またCD2の結合によるCD48からの副刺激が細胞傷害性T細胞の誘導に重要であること (Musgrave, B. L. et al., 2003. J. Interferon Cytokine Res. 23:67-81) などが報告されている。ヒトT細胞においても、他のGPIアンカー蛋白質同様に、抗CD48抗体でCD48をクロスリンクすると細胞内シグナル蛋白質のチロシンリン酸化の亢進 (Stefanov, I. et al., 1991. Science 254:1016-1019) や細胞内カルシウム濃度の上昇 (Stulnig, T. M. et al., 1997. J. Biol. Chem. 272:19242-19247) が起こることが知られている。ただし、CD48副刺激を受けることによるヒトT細胞の機能への影響については知られていない。

【0016】

【特許文献1】 国際公開 W099/12972号公報

【特許文献2】 特許公報 特表平2-503514

【非特許文献1】 Masuyama, J.ら、(2002) J. Immunol., 169, 3710

【非特許文献2】 Hale, G.ら、(1983) Blood, 62, 873

【非特許文献3】 Xia, M. Q.ら、(1991) European J. Immunol., 21, 1677

【非特許文献4】 Kirchhoff, C.ら、(1993) Molecular Reproduction and Development, 34, 8

【非特許文献5】 Pangolis GAら、(2001) Medical Oncology, 18, 99

【非特許文献 6】 Hederere RAら、(2000) International Immunology, 12, 505

【非特許文献 7】 Valentin Hら、(1992) Transplantation, 54, 97

【非特許文献 8】 Rowan WCら、(1994) International Immunology, 7, 69

【非特許文献 9】 Kirchhoff Cら、(2001) Cells Tissues Organs, 168, 93

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

本発明は、免疫調節能を有する調節性T細胞、該調節性T細胞を誘導する方法、該調節性T細胞を含む医薬組成物の提供を目的とする。具体的には、CD59、CD55およびCD48を含むGPIアンカー蛋白質を介した調節性T細胞の分化誘導および/または増殖促進方法、該方法により誘導された調節性T細胞、ならびに該調節性T細胞の自己免疫疾患、アレルギー疾患または移植免疫応答調節のための使用に関する。

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明者らは、CD52に対する抗体で調節性T細胞が分化誘導および/または増殖促進されることを見出している（特願2003-95765、特願2003-413786）。さらに、調節性T細胞の分化誘導について検討を進める中で、本発明者らは、T細胞に発現しているGPIアンカー蛋白質に注目した。そして、驚くべきことに、T細胞活性化において副刺激として作用するGPIアンカー蛋白質（特にCD59、CD55およびCD48）に対する抗体は、T細胞の活性化を介して、CD52に対する抗体の場合と同様に、調節性T細胞の分化誘導および/または増殖促進効果を有することを見出した。

【0019】

GPIアンカー蛋白質からの副刺激を与えてT細胞を活性化することにより、調節性T細胞の分化誘導および/または増殖促進に寄与することは、従来のGPIアンカー蛋白質に関する知見からは全く予測できなかった。したがって、GPIアンカー蛋白質の調節性T細胞分化誘導活性は、本発明において新規に見出されたものであり、この活性は、自己免疫疾患、アレルギー疾患または移植免疫応答調節における免疫療法に有用であり得る。

【0020】

すなわち、本発明は以下の通りである：

1. 免疫細胞の表面に存在するCD52以外のGPIアンカー蛋白質を、該蛋白質のアゴニストで刺激することを含む、調節性T細胞の分化誘導および/または増殖を促進する方法；
2. 上記GPIアンカー蛋白質がT細胞の活性化に関与するものである、上記1記載の方法；
3. 上記GPIアンカー蛋白質がCD55、CD59およびCD48からなる群より選択されたものである、上記1記載の方法；
4. 上記アゴニストが抗GPIアンカー蛋白質抗体またはそのフラグメントである、上記1記載の方法；
5. 抗GPIアンカー蛋白質抗体ヒト化抗体またはヒト抗体である、上記4記載の方法；
6. 免疫細胞の表面に存在するCD3を、CD3アゴニストで刺激することをさらに含む、上記1～5のいずれかに記載の方法；
7. CD3アゴニストが抗CD3抗体またはそのフラグメントである、上記6記載の方法；
8. 抗CD3抗体がヒト化抗体またはヒト抗体である、上記7記載の方法；
9. 上記免疫細胞がT細胞である、上記1～8のいずれかに記載の方法；
10. 上記免疫細胞が末梢血単核球である、上記9記載の方法；
11. 免疫細胞へのCD3アゴニスト刺激およびGPIアンカー蛋白質アゴニスト刺激が、生体外で行われるものである上記1～10のいずれかに記載の方法；
12. 免疫細胞へのCD3アゴニスト刺激およびGPIアンカー蛋白質アゴニスト刺激が、生体内で行われるものである上記1～10のいずれかに記載の方法；
13. 上記1～10のいずれかに記載の方法により分化誘導および/または増殖を促進することにより得られた調節性T細胞；
14. 上記1～10のいずれかに記載の方法により分化誘導および/または増殖を促進す

ることにより得られた調節性T細胞を含む細胞含有物；

15．上記1～10のいずれかに記載の方法により分化誘導および/または増殖を促進することにより得られた調節性T細胞を含む、免疫抑制のための医薬組成物；

16．自己免疫疾患、アレルギー疾患または移植免疫応答の予防または治療のための、上記15記載の医薬組成物；

17．調節性T細胞の分化誘導および/または増殖促進効果を有する薬剤となる、CD52以外のGPIアンカー蛋白質に対するヒト化抗体または抗体を作製する方法；

18．GPIアンカー蛋白質が、CD55、CD59およびCD48からなる群より選択されたものである、上記17記載の方法；

19．調節性T細胞の分化誘導および/または増殖促進効果を有する薬剤を、CD52以外のGPIアンカー蛋白質との相互作用を指標にスクリーニングする方法であって、CD52以外のGPIアンカー蛋白質を発現している細胞と候補化合物とを接触させ、これらの相互作用またはGPIアンカー蛋白質刺激応答を検出することを含む、上記方法；

20．GPIアンカー蛋白質が、CD55、CD59およびCD48からなる群より選択されたものである、上記19記載の方法；

21．患者本人又は別のヒトの生体内から採取した免疫細胞を、その表面に存在するCD52以外のGPIアンカー蛋白質を該蛋白質のアゴニストで刺激することにより、調節性T細胞への分化を誘導し、かつその増殖を促して得られた、上記ヒトの免疫細胞由来の調節性T細胞；

22．GPIアンカー蛋白質が、CD55、CD59およびCD48からなる群より選択されたものである、上記21記載の細胞；

23．上記21または22記載の調節性T細胞であって、上記採取した免疫細胞を、上記アゴニストで刺激することに加えて、さらにCD3アゴニストで刺激することにより、調節性T細胞への分化を誘導し、かつその増殖を促して得られた、調節性T細胞；

24．患者本人又は別のヒトの生体内から採取した免疫細胞を、その表面に存在するCD52以外のGPIアンカー蛋白質を該蛋白質のアゴニストで刺激することにより、調節性T細胞への分化を誘導し、かつその増殖を促し、上記ヒトの免疫細胞由来の調節性T細胞を産生する方法；

25．GPIアンカー蛋白質が、CD55、CD59およびCD48からなる群より選択されたものである、上記24記載の方法；

26．上記24または25記載の調節性T細胞を産生する方法であって、上記採取した免疫細胞を、上記アゴニストで刺激することに加えて、CD3アゴニストで刺激することをさらに含む、方法；

27．CD52以外のGPIアンカー蛋白質のアゴニストを有効成分として含有する、調節性T細胞の分化誘導および/または増殖促進のための医薬組成物；

28．上記GPIアンカー蛋白質がT細胞の活性化に関与するものである、上記27記載の医薬組成物；

29．上記GPIアンカー蛋白質がCD55、CD59およびCD48からなる群より選択されたものである、上記27記載の医薬組成物；

30．上記アゴニストが抗GPIアンカー蛋白質抗体またはそのフラグメントである、上記27記載の医薬組成物；

31．上記抗体がヒト化抗体またはヒト抗体である、上記30記載の医薬組成物；

32．CD3アゴニストをさらに含む、上記27記載の医薬組成物；

33．CD3アゴニストが抗CD3抗体またはそのフラグメントである、上記32記載の医薬組成物；

34．抗CD3抗体がヒト化抗体またはヒト抗体である、上記33記載の医薬組成物；ならびに、

35．自己免疫疾患、アレルギー疾患または移植免疫応答の予防または治療のための、上記27～34のいずれかに記載の医薬組成物。

【発明の効果】

【0021】

本発明により、CD59、CD55およびCD48を含むGPIアンカー蛋白質を介した副刺激を受けて活性化したT細胞は調節性T細胞に分化誘導および/または増殖促進されることが明らかとなった。これら調節性T細胞は、自己免疫疾患、アレルギー疾患および移植免疫応答調節のための医薬品組成物の有効成分として有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

本発明は、GPIアンカー蛋白質のアゴニストによる、調節性T細胞の分化誘導効果および/または増殖促進効果、ならびにこれを介した免疫抑制効果に関する。したがって、GPIアンカー蛋白質のアゴニストを有効成分として含有する上記効果のための医薬組成物、該アゴニストを用いた調節性T細胞の分化誘導および/または増殖促進方法、ならびにこれを介した免疫抑制方法に関する。免疫細胞（特にT細胞）の細胞表面上のGPIアンカー蛋白質をそのアゴニストで刺激することにより、調節性T細胞の分化誘導が誘起され、その機能を維持したままの調節性T細胞の増殖が促進され、その結果、生体内における免疫抑制効果が得られる。

【0023】

本明細書において、GPIアンカー蛋白質のアゴニストとは、GPIアンカー蛋白質と相互作用する物質であって、免疫細胞表面に存在するGPIアンカー蛋白質を刺激することにより、該蛋白質を介して細胞内へシグナルを伝達し得る物質を意味する。上述のとおり、GPIアンカー蛋白質は、200種類以上見出されており、その中でも、マウスではThy-1、Ly-6およびQa-2、ヒトではCD52、CD55、CD59、CD73、CD48およびBY55/CD160等が、T細胞上に発現し、該細胞の活性化に関与していることが報告されている。したがって、本発明のGPIアンカー蛋白質は、T細胞表面に存在するいずれのGPIアンカー蛋白質であってもよく、ヒトに関して用いる場合は、CD55、CD59、CD73、CD48およびBY55/CD160が好ましいが、これらに限定されるものではない。GPIアンカー蛋白質のアゴニスト刺激により誘導されたシグナルは、細胞の調節性T細胞への分化および/または調節性T細胞としての特性を保持した状態での増殖という応答を誘起し得る。GPIアンカー蛋白質のアゴニストは、GPIアンカー蛋白質に対する天然または合成のリガンド、すなわちGPIアンカー蛋白質を介して細胞内シグナルを誘導するあらゆる分子を含み、GPIアンカー蛋白質に対する抗体およびそのフラグメントも包含する。かかる抗体は、GPIアンカー蛋白質を介して細胞内シグナルを誘導し得るものであれば、GPIアンカー蛋白質のいずれの部位を認識するものであってもよい。例えば、CD55、CD59に対する抗体、またはCD48に対する抗体も、GPIアンカー蛋白質のアゴニストに含まれ得る。

【0024】

本発明に使用する抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれでも良く、当業者に公知の方法（例えば、「新生化学実験講座1，タンパク質I，389-406，東京化学同人」参照）により調製することが可能である。本発明の実施例に記載した調節性T細胞の分化・増殖誘導能を評価する工程を組み合わせることによっても、本発明に使用する抗体を容易に取得することができる。また、市販のものを利用することも可能である。本発明に使用する好ましい抗体として、例としては、抗CD55抗体、抗CD59抗体、および抗CD48抗体が挙げられ、これらは、種々のものが市販されており、例えば、Serotec社から市販されているMEM-43抗CD59抗体、Wako社から市販されている抗CD55抗体1C6クローンおよびSerotec社から市販されている抗CD48抗体MEM102クローンなどが挙げられる。さらには、GPIアンカー蛋白質に対する抗体の可変領域を、ヒト抗体のフレームワークに移植して得られるいわゆるヒト化抗体を、本発明のGPIアンカー蛋白質のアゴニストとして用いることも可能である。また、再配列されていないヒト抗体遺伝子を保持し、抗原の感作により当該抗原に特異的なヒト抗体を産生するマウス（例えばTomizuka et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722）を使用して、ヒト抗体を取得し、その抗体を本発明に使用することも可能である。

【0025】

本発明の方法において、CD3およびGPIアンカー蛋白質を発現する免疫細胞に対して、CD3アゴニストに加えてGPIアンカー蛋白質のアゴニストを作用させることにより調節性T細胞への分化誘導および/または細胞増殖を促進させることもできる。すなわち、T細胞分化に関与する主たる刺激伝達経路であるCD3シグナル伝達系が主刺激経路であり、GPIアンカー蛋白質を介した経路がいわゆる副刺激経路である。本明細書において、CD3を介した刺激に加えてGPIアンカー蛋白質を介した刺激をもたらすことを、GPIアンカー蛋白質副刺激と称することがある。本明細書においてCD3アゴニストとは、免疫細胞の表面に発現したCD3分子に作用してCD3を介した細胞内へのシグナル伝達を誘導し、該シグナル伝達により当該細胞の分化が促進されるという反応を誘起しうるあらゆる物質を意味する。CD3アゴニストの例としては、アゴニスティックな抗CD3抗体、例えばOKT3 (ATCC CRL-8001)、UCHL1 (B. D. PharMingen)、HIT3a (B. D. PharMingen) が挙げられる。また、種々のT細胞抗原受容体に対するアゴニスト、特にアゴニスト作用を有する抗体またはそのフラグメントも、T細胞抗原受容体とCD3の複合体形成をもたらし、CD3を介した細胞内への信号伝達をもたらすので、本発明におけるCD3アゴニストとして使用することができる。具体的には、ヒトT細胞抗原受容体Vbeta6.7に対する抗体であるOT145 (Posnett et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83(20):7888-92) などが挙げられる。また、可溶性のHLA分子あるいはHLA分子と抗原ペプチドのテトラマー分子のような、T細胞抗原受容体が認識してアゴニスト作用を及ぼす物質も使用し得る。

【0026】

上述のとおり、CD3とGPIアンカー蛋白質とを共に刺激することによって調節性T細胞の分化誘導が促進され、かつ/または調節性T細胞の増殖が促進されるため、このCD3とGPIアンカー蛋白質とを同時刺激することにより、生体内で起きている過剰な免疫反応を制御できる可能性がある。したがって、本発明により提供される、GPIアンカー蛋白質のアゴニストを有効成分として含有する医薬組成物、および該アゴニストとCD3アゴニストとを有効成分として含有する医薬組成物は、免疫抑制剤として有用であり得る。該医薬組成物は、さらに特定の免疫系の作用機序を標的とする薬剤として、調節性T細胞の分化誘導および/または増殖促進剤として有用であり得る。

【0027】

また、本発明によって提供される、医薬組成物は、生体内に投与されるものであってもよいし、患者または別のヒトから採取した免疫細胞、特にT細胞、あるいは免疫細胞を含む末梢血、臍帯血、骨髓細胞、リンパ液、リンパ節細胞、胸腺細胞を生体外で処理するためのものであってもよい。

【0028】

本発明の医薬組成物は、周知の方法で製剤化されうる。すなわち治療効果上許容される種々の添加物、例えば担体、pH緩衝剤、安定化剤、賦形剤等を添加した医薬製剤が製造される。このような製剤は、好ましくは、生理学的に許容され得る希釈剤またはキャリアを含んでおり、適切なキャリアには、生理的食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水グルコース液、および緩衝生理食塩水が含まれるが、これらに限定されるものではない。或いは、GPIアンカー蛋白質のアゴニストは凍結乾燥（フリーズドライ）状態で提供され、必要な時に上記の緩衝水溶液を添加することにより再構成して使用されるものであってもよい。上記製剤の投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、または、注射剤、点滴剤、坐薬等による非経口投与を挙げることができる。

【0029】

上記医薬組成物の投与方法および投与量は、前臨床試験、臨床試験の過程において適宜決定され得る。例えば、症状、年齢、体重などによって異なるが、通常、経口投与では、成人に対して、1日約0.01mg～1000mgであり、これらを1回、または数回に分けて投与することができる。また、非経口投与では、1回約0.01mg～1000mgを皮下注射、筋肉注射または静脈注射によって投与することができる。

【0030】

治療の対象となる疾患は、免疫抑制効果をもたらす処置が必要とされる疾患であり、具体的には、移植免疫応答、すなわち移植片対宿主病（GvHD）または移植片拒絶、アレルギー性疾患、およびリウマチなどの自己免疫疾患が挙げられる。移植片対宿主病または移植片拒絶の治療または予防を目的として、臓器又は細胞移植前後における処置に、本発明の医薬組成物および本発明の方法を用いることもできる。

【0031】

本発明において、上記治療または予防を必要とする患者本人もしくは別のヒトから採取した免疫細胞、または該免疫細胞を含む、末梢血、臍帯血、骨髄細胞、リンパ液、リンパ節細胞もしくは胸腺細胞を生体外で、GPIアンカー蛋白質のアゴニストで、または場合によっては該アゴニストおよびCD3アゴニストで処理し、調節性T細胞を増殖させ、増殖した該細胞を、患者の体内に戻す療法を採用することができる。

【0032】

該免疫細胞のアゴニストによる刺激の条件は、GPIアンカー蛋白質アゴニストによりGPIアンカー蛋白質を介した細胞内シグナルが伝達され、かつCD3アゴニストによる刺激も行いう場合には、該刺激によりCD3を介した細胞内シグナルが伝達されるのに十分な量の、各アゴニストで刺激を行えばよい。その量は、アゴニストの種類によって異なり、使用するアゴニストの適切な量およびアゴニスト刺激に供する時間は、当業者であれば、簡単な試験により決定することができる。刺激に供する時間は、一般的には、12時間以上、より好ましくは24時間以上、例えば3日間程度が好ましい。

【0033】

本発明は、したがって、同一人または別のヒトに戻すことを前提として、上記方法で調節性T細胞を生体外で分化増殖させる方法、およびそれにより得られた調節性T細胞も包含する。本発明の方法によると、1個体に由来する調節性T細胞、すなわち遺伝形質の均一な調節性T細胞を、従来技術では得ることが困難であった治療に有効な量で得ることが可能である。

【0034】

末梢血または骨髄細胞を生体より採取し、患者の体内に戻す幹細胞移植療法はすでに実施されている。また、免疫細胞の1種である樹状細胞（dendritic cell）に人為的処理を施し、患者の体内に戻す癌治療も行われている（M. Jefford, et al., The Lancet Oncology, 2: 343-353, June, 2001）。採取された免疫細胞にGPIアンカー蛋白質のアゴニストおよびCD3アゴニストを作用させることにより、調節性T細胞の分化誘導および/または増殖を促進することができ、該調節性T細胞を増殖させた後に患者の体内に戻すことにより治療または予防効果を奏することができる。このようないわゆるエキスビボ（ex vivo）の方法は、基礎研究の場において開発された実験系をほぼそのまま治療の場において再現するものであるとも言える。薬剤の生体内への投与が、体内吸収、代謝、または未知の因子による干渉作用などの影響により、期待した治療効果を奏し得ない場合があり得ることと比較すると、実用化におけるリスクのより低い方法である。

【0035】

さらに、本発明は、調節性T細胞の分化誘導および/または増殖促進効果を有する薬剤の開発のために、GPIアンカー蛋白質を発現している細胞と候補化合物とを接触させ、その相互作用またはGPIアンカー蛋白質刺激応答を検出することにより、GPIアンカー蛋白質との相互作用を指標として、GPIアンカー蛋白質のアゴニストとなる化合物をスクリーニングすることも包含する。ここで、GPIアンカー蛋白質刺激応答とは、例えば、調節性T細胞の分化誘導活性または増殖促進活性であってよい。

【実施例】

【0036】

実施例1：抗CD59抗体副刺激による調節性T細胞の誘導

CD59を抗原とするモノクローナル抗体の副刺激によってCD4陽性T細胞から調節性T細胞が誘導されるかどうかを検討した。

【0037】

プレートへの抗体の固相化は次のように行った。生理的リン酸緩衝液 (PBS) 中で100 ng/mlに調製した抗CD3抗体 (ORTHOCONE OKT3, Ortho Biotech) を48-wellプレート (Costar) に分注して4℃で24時間インキュベートして、該抗体をプレートに固相化した後、30 µg/ml PBSの抗CD59抗体 (MEM-43, Serotec) で、さらに上記と同様に固相化した。末梢血単核球は健常人ボランティア末梢血からFicoll-Paque Plus (Amersham Pharmacia) を用いた密度勾配遠心法により分離した。CD4陽性T細胞は、末梢血単核球よりMACS CD4+ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) を用いて試薬製造者の操作手順書に従ってネガティブセレクションによって調製した。得られたCD4陽性T細胞を、10% FCSと15 mMのHEPESバッファーを添加したRPMI 1640培地 (GIBCO) に懸濁し、前述の抗CD3抗体と抗CD59抗体とを固相化したプレートに 8×10^5 cells/wellとなるように播種し、CO₂インキュベーター中で37℃/5% CO₂環境下にて3日間培養した。培養3日目に細胞を回収、洗浄し、培地に再懸濁して24-wellプレート (Costar) に 1×10^6 cells/wellとなるように播種し、4日間無刺激下で培養した。これにより細胞は休止状態となる。その後、該細胞を、抗CD59抗体副刺激細胞として抑制アッセイに供した。抗CD59抗体による副刺激によって培養3日目で90%以上の細胞が活性化し、CD25陽性となった。また、培養7日目の細胞数は播種時の1.5倍程度に増殖していた。

【0038】

抑制アッセイは次のように行った。96-wellU底プレート (ICN) に、CD4陽性T細胞 1×10^5 cells/wellをX線照射 (5,000 rads) した末梢血単核球 4×10^5 cells/wellと共に播種し、抗CD3抗体を最終濃度25 ng/mlとなるように添加して3日間培養した。このとき、調節性T細胞を加えなかった対照群と調節性T細胞としてX線照射 (5,000 rads) した抗CD59抗体副刺激細胞を $1 \sim 2 \times 10^5$ cells/wellで添加した群とで、³Hチミジン取り込みを比較して抑制活性を評価した。³Hチミジン取り込みは、培養3日目に0.2 µCi/wellの³Hチミジンを添加して8時間後に細胞を回収し、細胞に取り込まれた³Hチミジンのカウントをベータプレート (PerkinElmer) で測定することにより評価した。1回のアッセイに用いた細胞は全て同一提供者由来である。

【0039】

図1に示したように、抗CD59抗体副刺激細胞は、抗CD3抗体刺激によるCD4陽性T細胞の増殖を、添加された該副刺激細胞の数に依存して抑制した。これより、抗CD59抗体副刺激により調節性T細胞が誘導されることが明らかとなった。

【0040】

実施例2：抗CD55抗体副刺激による調節性T細胞の誘導

CD55を抗原とするモノクローナル抗体の副刺激によってCD4陽性T細胞から調節性T細胞が誘導されるかどうかを検討した。

【0041】

副刺激細胞の調製、抑制アッセイは実施例1に記載の方法で実施した。ただし、抗CD59抗体の代わりに抗CD55抗体 (クローン1C6, Wako) を用いた。ここで使用した抗CD55抗体は副刺激能が低く、該刺激によっては一部の細胞しか活性化し得なかったため、FACS Vantage SE (Becton Dickinson) を用いてCD25の発現を指標として、活性化細胞と非活性化細胞とに分離した。そのそれぞれについて抑制アッセイを実施した。

【0042】

活性化細胞と非活性化細胞の分離は次のように実施した。実施例1に記載の方法に準じて抗CD3抗体と抗CD55抗体を固相化したプレート上で、CD4陽性T細胞を培養し、3日目に細胞を回収・洗浄後、2%自己血漿および2 mM EDTA含有リン酸バッファー中でFITC標識抗CD25抗体 (BD Pharmingen) を添加して、4℃で30分間反応させた。その後、細胞を洗浄して結合しなかった抗体を除去し、細胞を2%自己血漿および2 mM EDTA含有リン酸バッファーに懸濁した。1%の7-AAD solution (BD Pharmingen) を添加して、死細胞を染色し、7-AAD陰性の生細胞のうちCD25-FITC陽性群と非陽性群とをFACS Vantage SE (Becton Dickinson) にて分離・回収した。回収後のCD25陽性細胞群のCD25陽性率を指標とした純度は94%以上であった。以降、分離後の細胞を実施例1と同様に4日間無刺激下で培養した後、抑制アッ

セイに用いた。抑制アッセイは実施例1に記載の方法で実施した。

【0043】

図2に示したように、抗CD55抗体副刺激を受けた細胞のうち、CD25陰性の非活性化細胞には抑制活性が見られなかったが、CD25陽性の活性化細胞は、抗CD3抗体刺激によるCD4陽性T細胞の増殖を、該活性化細胞数に依存して抑制した。抗CD55抗体副刺激によって活性化した細胞は調節性T細胞の性質を獲得することが明らかとなった。

実施例3：抗CD48抗体副刺激による調節性T細胞の誘導

CD48を抗原とするモノクローナル抗体の副刺激によってCD4陽性T細胞から調節性T細胞が誘導されるかどうかを検討した。

【0044】

副刺激細胞の調製、抑制アッセイは実施例1に記載の方法で実施した。ただし、抗CD59抗体の代わりに抗CD48抗体（クローンMEM102, Serotec）を用いた。

【0045】

図3に示したように、抗CD48抗体副刺激細胞はCD4陽性T細胞の抗CD3抗体刺激による増殖を添加細胞数依存的に抑制し、抗CD48抗体副刺激により調節性T細胞が誘導されることが明らかとなった。

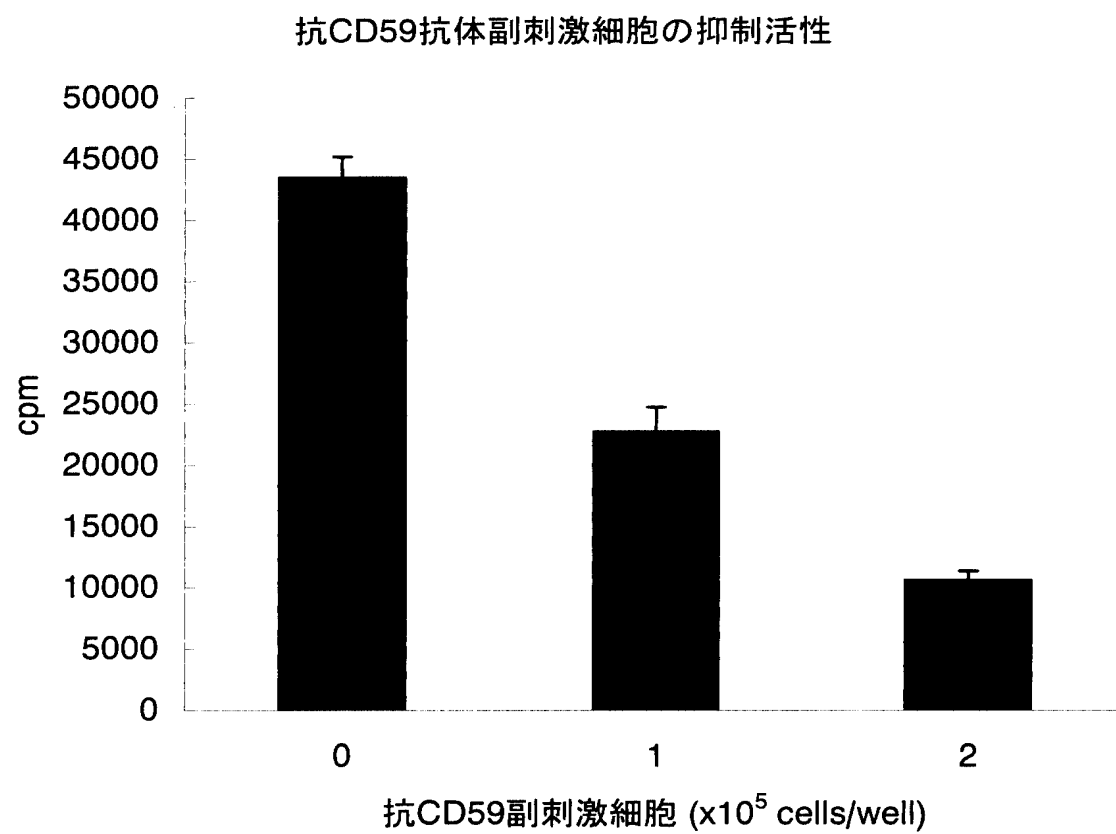
【図面の簡単な説明】

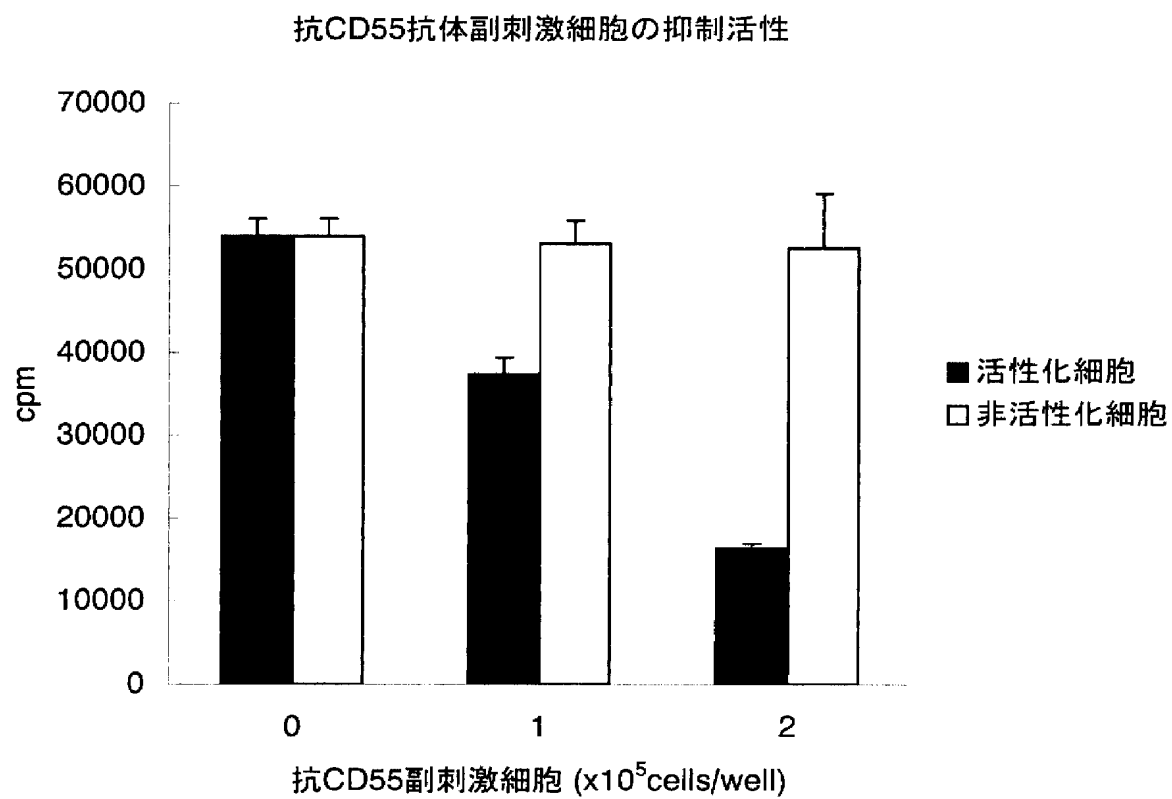
【0046】

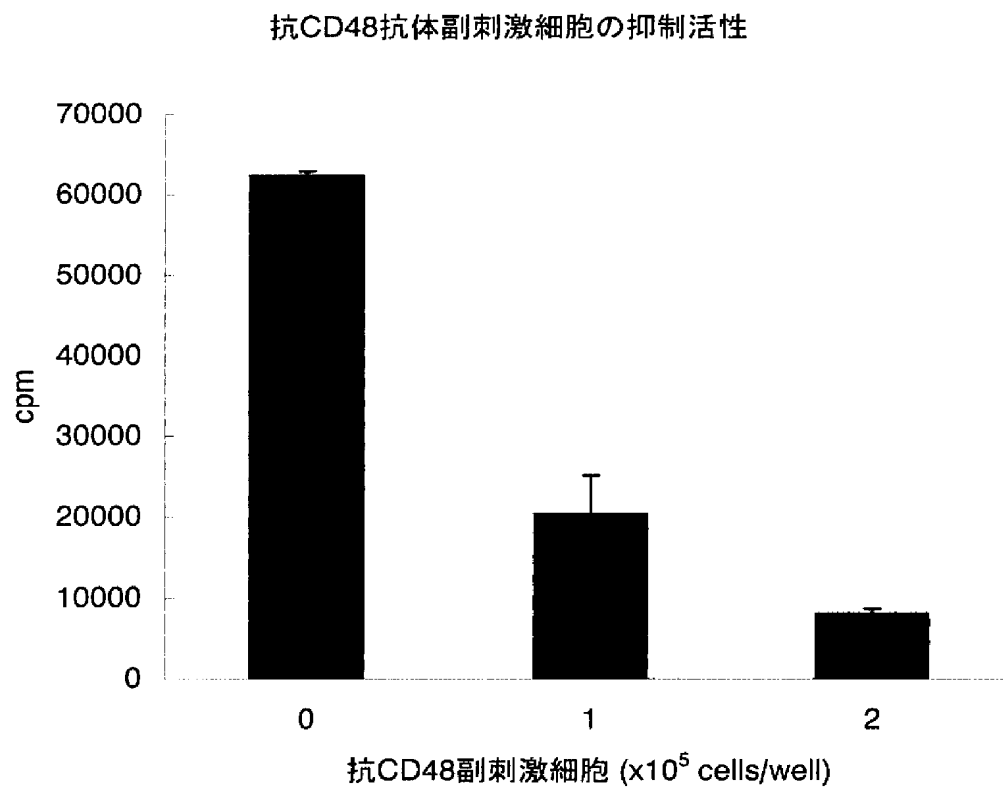
【図1】 図1は、CD4陽性T細胞の抗CD3抗体刺激による増殖に対する、抗CD59抗体により誘導された調節性T細胞による抑制効果を調べた結果である。

【図2】 図2は、CD4陽性T細胞の抗CD3抗体刺激による増殖に対する、抗CD55抗体により誘導された調節性T細胞による抑制効果を調べた結果である。

【図3】 図3は、CD4陽性T細胞の抗CD3抗体刺激による増殖に対する、抗CD48抗体により誘導された調節性T細胞による抑制効果を調べた結果である。







【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、調節性T細胞の分化誘導および/または増殖促進方法、ならびにこれらの方法による免疫を抑制する方法、さらに、これらの方法に用いるための医薬組成物を提供することを目的とする。

【解決手段】 GIPアンカー蛋白質のアゴニストをGIPアンカー蛋白質発現T細胞に作用させることによる、調節性T細胞の分化誘導および/または増殖促進方法、当該方法による免疫を抑制する方法が提供される。

【選択図】 なし

出願人履歴

0 0 0 2 5 3 5 0 3

19950614

住所変更

東京都中央区新川二丁目 1 0 番 1 号

麒麟麦酒株式会社